

吲哚-3-原醇对猪血清诱导大鼠肝纤维化的治疗作用

平 洁^{1,2}, 高爱梅¹, 徐 丹^{1,2}, 李瑞雯¹, 汪 晖^{1,2*}

(武汉大学 1. 基础医学院药理学系, 2. 食品与药品评价研究中心, 湖北 武汉 430071)

摘要: 研究吲哚-3-原醇 (I3C) 对猪血清诱导大鼠肝纤维化的治疗作用及其机制。腹腔注射猪血清制备大鼠肝纤维化模型, 造模成功后用 I3C 治疗 17 天。采用 HE 和 Masson 三色染色法分别观察肝脏病理学和胶原含量改变; 生化比色法测定肝组织羟脯氨酸 (Hyp) 含量; 免疫组织化学法观察肝脏中 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 的表达。进一步培养大鼠肝星状细胞株 HSC-T6, 用 I3C 处理 24 h 后, FITC-Annexin V/PI 双重染色法检测细胞凋亡; 实时荧光定量 PCR 法检测细胞凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 的 mRNA 表达。结果显示, 与模型对照组比较, 各 I3C 治疗组的肝组织 Hyp 含量不同程度降低, 肝细胞损伤减轻, 胶原纤维沉积减少 ($P < 0.01$), α -SMA 表达降低 ($P < 0.01$)。细胞实验显示, I3C 可明显增加 HSC-T6 细胞凋亡率, 升高 Bax/Bcl-2 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$)。以上结果说明, I3C 对猪血清诱导大鼠肝纤维化有一定治疗作用, 可能与其诱导活化 HSC 凋亡继而促进基质胶原降解有关。

关键词: 吲哚-3-原醇; 肝纤维化; 肝星状细胞; 细胞凋亡; 胶原

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 08-0915-07

Therapeutic effect of indole-3-carbinol on pig serum-induced hepatic fibrosis in rats

PING Jie^{1,2}, GAO Ai-mei¹, XU Dan^{1,2}, LI Rui-wen¹, WANG Hui^{1,2*}

(1. Department of Pharmacology, Basic Medical School,

2. Research Center of Food and Drug Evaluation, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Abstract: This study is to investigate the therapeutic effect and mechanism of indole-3-carbinol (I3C) on pig serum-induced liver fibrosis of rats. The liver fibrotic model of rats was induced by pig serum. After models were successfully established, rats in the treatment groups were administered with I3C through intraperitoneal injection or curcumin by intragastric administration, daily for 17 days. Hepatic hydroxyproline (Hyp) content was measured. The liver histology and immunohistochemistry with α -smooth muscle actin (α -SMA) were assayed. Hepatic stellate cells line, HSC-T6 was incubated with different concentrations of I3C (25, 50, and 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 h. The effect of I3C on cell apoptosis was identified by FITC-Annexin V/PI double labeled assay. And the mRNA expressions of Bax and Bcl-2 were measured by real time RT-PCR. The results showed that hepatic content of Hyp decreased by I3C treatment, as compared with the fibrotic model control. Histopathological changes, such as steatosis, necrosis, deposition of collagenous fiber reduced remarkably and the expression of α -SMA was significantly down-regulated in the I3C-treated groups ($P < 0.01$). Apoptosis analysis showed that I3C significantly increased HSC-T6 apoptosis rate and the expressional ratio of Bax to Bcl-2. The results indicated that I3C could effectively cure pig serum-induced liver fibrosis *in vivo* by inducing HSC apoptosis and promoting ECM degradation.

收稿日期: 2011-01-27.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81072709, 81001466); 湖北省自然科学基金资助项目 (2008CDB117).

*通讯作者 Tel: 86-27-68758665, Fax: 86-27-87331670, E-mail: wanghui19@whu.edu.cn

Key words: indole-3-carbinol; liver fibrosis; hepatic stellate cell; apoptosis; collagen

肝纤维化是所有慢性肝病(如病毒性肝炎、酒精性肝病、药物性肝炎等)进展成肝硬化的共同病理基础与必经阶段,是影响慢性肝病预后的重要环节^[1]。加强抗肝纤维化治疗新药物开发并阐明其分子机制的研究,对于防治肝硬化具有重要的现实意义。肝纤维化的病理学基础为细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成增加,降解减少,导致胶原过度沉积。而肝脏内主要胶原合成细胞——肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)的激活、增殖是肝纤维化发生的中心环节^[2]。因此,抑制HSC活化、增殖及细胞外基质的生成已成为有效防治肝纤维化的重要策略之一。越来越多的基础与临床研究发现,肝纤维化甚至肝硬化是能够逆转的,逆转过程的始动因素是活化HSC的凋亡^[3,4]。因此,促进活化HSC的凋亡以及已沉积胶原的降解被认为是抗肝纤维化更为有效的策略,将HSC凋亡的调控作为逆转肝纤维化的重要途径已受到越来越多的关注。

吲哚-3-原醇(indole-3-carbinol, I3C)是葡萄糖蔓苜蓿的前体,大量存在于十字花科类食用蔬菜(如西兰花等)。以往研究发现,I3C具有抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、清除氧自由基和抗脂质过氧化等作用,可用来治疗胸部、消化道、肝脏和前列腺等处的肿瘤^[5-7]。作者前期分别在肝切片和细胞水平,证实I3C对肝细胞有保护作用,且能抑制HSC的增殖,促进基质胶原降解^[8,9]。然而,I3C在整体动物水平是否具有逆转肝纤维化作用,其机制是否与促HSC凋亡有关,目前国内外尚未见报道。本研究利用猪血清制备大鼠肝纤维化模型,观察I3C对肝纤维化的治疗作用,并初步探讨其作用机制。

材料与方法

药品与试剂 I3C及胰蛋白酶购自Sigma公司(美国);无菌猪血清为郑州佰安生物工程有限公司产品;姜黄素由国药集团化学试剂有限公司提供。羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; α -平滑肌肌动蛋白多克隆抗体(α -smooth muscle actin, α -SMA)免疫组化SP法试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;高糖型DMEM和胎牛血清(fetal calf serum, FCS)购自Gibco公司;FITC-Annexin V/PI荧光染色试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司;Trizol及HiBindTM PCR

产物回收试剂盒购自Omega公司(美国);逆转录试剂盒及实时荧光定量PCR(real time PCR)试剂盒购自大连宝生物工程有限公司;DNA分子量Marker为北京天为时代有限公司产品。其余化学试剂皆为分析纯。

实验动物与肝星状细胞 雄性Wistar大鼠,体重(150 ± 5) g,由湖北省疾病预防控制中心提供,SPF级,许可证号:SCXK(鄂)2006-2008。肝星状细胞株HSC-T6细胞由美国Scott L. Friedman教授惠赠,是猿猴空泡病毒40(SV40)转染Sprague-Dawley大鼠HSC而形成的,具有活化的HSC表型^[10]。

肝纤维化模型及药物处理 56只大鼠普通饲料适应性饲养1周后,分成7组:正常对照组,I3C对照组(12 mg·kg⁻¹·d⁻¹,腹腔注射),模型对照组,I3C(3、6和12 mg·kg⁻¹·d⁻¹,腹腔注射)剂量组和姜黄素(200 mg·kg⁻¹·d⁻¹,灌胃)对照组。参照文献^[11]方法,后5组大鼠腹腔注射无菌猪血清(5 mL·kg⁻¹),每周2次,共6周,以复制大鼠免疫性肝纤维化模型,正常对照组和I3C对照组腹腔注射等体积灭菌水(5 mL·kg⁻¹)。造模成功后开始给药,正常对照组和模型对照组则腹腔注射等体积橄榄油(0.5 mL·kg⁻¹)。连续17天,末次给药1 h后,断头处死动物,于肝右叶取部分肝组织,用4%多聚甲醛固定,余下组织在-80℃冻存。

动物一般情况 观察大鼠的精神状态、活动、皮毛光泽、食量及体重变化等。

病理学检测 部分肝组织以4%多聚甲醛固定24 h后,脱水,石蜡包埋,切片,进行HE和Masson三色染色,观察肝组织病理学改变及胶原含量变化。Masson染色照片在全自动图像分析系统上采用HMIAS-2000型图像分析软件(千屏影像技术公司,武汉)进行半定量分析,每张切片随机选取5个视野(×200倍),测定亮绿色胶原总面积,取平均值,计算其占视野总面积的百分比。

生化指标检测 按试剂盒说明书,采用比色法测定肝组织Hyp含量。

免疫组化SP法检测 α -SMA 切片常规脱蜡至水,微波修复5 min,3% H₂O₂室温孵育15 min,正常兔血清37℃封闭15 min;一抗 α -SMA多克隆抗体(1:200)37℃孵育2 h;生物素化二抗37℃孵育20 min;三抗37℃孵育20 min;DAB显色,苏木精复

染核, 逐级脱水, 透明, 封片。在显微镜下每张玻片随机选取 5 个视野 ($\times 400$ 倍), 输入 HMIAS-2000 高清晰彩色图文分析仪, 检测阳性细胞区域的面积平均值。

FITC-Annexin V/PI 双重染色检测 HSC-T6 凋亡 将 HSC-T6 细胞培养于含 10% FCS、 $100 \text{ u}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素和 $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素的高糖型 DMEM 培养液中。调整细胞悬液的细胞数为 $5\times 10^4/\text{mL}$, 转入 6 cm 培养皿培养至 70%~80% 融合, 更换为无血清培养液孵育 24 h 使细胞同步化。随后加入不同浓度 I3C (25 、 50 及 $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 继续孵育 24 h。收获细胞约 1×10^6 个, PBS 充分洗涤细胞, $1\ 200 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min; 采用结合缓冲液 $250 \text{ }\mu\text{L}$ 重悬细胞, 调整细胞数为 $2\times 10^4\sim 5\times 10^4/\text{mL}$, 取细胞悬液 $195 \text{ }\mu\text{L}$, 加入 FITC-Annexin V $5 \text{ }\mu\text{L}$, 室温下避光作用 10 min; 结合缓冲液 $190 \text{ }\mu\text{L}$ 洗 1 遍细胞, $1\ 500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min; 结合缓冲液 $190 \text{ }\mu\text{L}$ 重悬细胞, 加入 PI $10 \text{ }\mu\text{L}$; 流式细胞仪 (Beckman 公司, 美国) 检测细胞的凋亡情况。

实时荧光定量 PCR 法检测 Bax 和 Bcl-2 的 mRNA 表达 按“FITC-Annexin V/PI 双重染色检测 HSC-T6 凋亡”方法接种和 I3C 处理 HSC-T6 细胞。收集 $1\times 10^6\sim 1\times 10^7$ 个细胞, 用 Trizol 提取总 RNA, 分光光度法测定总 RNA 含量及纯度。取总 RNA $2 \text{ }\mu\text{g}$, 按逆转录试剂盒说明书进行 cDNA 合成。应用引物设计软件 Primer Premier 5.0 (PREMIER Biosoft International) 进行引物设计, 并将设计出的引物输入 BLAST 数据库中进行同源性比较, 得到特异的引物序列 (表 1), 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。按试剂盒说明书进行实时荧光定量 PCR 测定, 反应体系为 $25 \text{ }\mu\text{L}$, 采用仪器为 Gene 3000 型荧光 PCR 仪 (Corbett Research 公司, 澳大利亚)。各基因的反应条件见表 1。取 PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 以判断产物的特异性。然后将待测基因的 PCR 产物用胶回收试剂盒进行纯化, 按 10 倍梯度稀释即可得到标准品, 用于标准曲线制作。采用标准

曲线相对定量法, 应用 Rotor-Gene 6.0 软件 (Corbett Research 公司, 澳大利亚) 对待测基因的 mRNA 表达水平进行计算。将待测基因的 mRNA 表达相对量 V 值与同一样本内参基因 GAPDH 的 V 值相比 ($R_v = V_{\text{待测}}/V_{\text{GAPDH}}$), 所得比值 R_v 代表样本待测基因 mRNA 的相对表达量。

统计学处理 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。数据采用 SPSS 10.0 软件分析。图表制作以 Prism 4.0 软件操作。

结果

1 I3C 对肝纤维化大鼠一般情况、肝脏组织病理学的影响

1.1 一般情况 整个实验过程中无大鼠死亡, 正常对照组大鼠一般情况良好, 活跃, 毛顺且有光泽, 饮食及大小便正常; 模型对照组大鼠精神萎靡, 皮毛无光泽, 活动、饮食、体重增长率及大小便与其他各组无明显差异。I3C 和姜黄素治疗组大鼠一般状态均好于模型对照组。

1.2 肝脏外观及病理学检查 正常对照组大鼠肝脏柔软光滑, 呈红褐色; 模型对照组大鼠肝脏呈暗红色, 质地偏硬, 表面粗糙, 可见细小颗粒。I3C 和姜黄素治疗组大鼠的肝脏在质地、色泽和病理改变上均有不同程度改善。

HE 染色显示: 正常对照组 (图 1A) 和 I3C 对照组 (图 1B) 大鼠的肝小叶结构完整, 肝索排列整齐, 无炎性细胞浸润及纤维组织增生; 模型对照组 (图 1C) 大鼠肝小叶结构破坏, 肝索紊乱, 肝细胞大量变性、坏死, 多为弥漫性水样变性和脂肪变性, 炎细胞浸润明显, 纤维组织增生明显, 形成厚薄不一的纤维间隔, 伸入肝小叶, 局部有假小叶形成; 与模型对照组相比, I3C $12 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组 (图 1D) 和姜黄素对照组 (图 1E) 炎细胞浸润、组织坏死及纤维组织增生均明显减轻, 部分肝小叶结构有所恢复, 肝索排列较规则, 纤维间隔缩短变窄。

Table 1 Primers and reaction conditions of cell apoptosis related proteins

Gene	Sense primer (5'-3')	Antisense primer (5'-3')	Reaction condition and product size	GenBank No.
Bax	TGTTTGCTGATGGCAACTTC	GATCAGCTCGGGCACTTTAG	95 °C 10 s; 95 °C 5 s, 60 °C 20 s, 45 cycles; 104 bp	NM017059
Bcl-2	TCTGTGGATGACTGAGTACCTGAA	AGAGACAGCCAGGAGAAATCAAA	95 °C 10 s; 95 °C 5 s, 62 °C 20 s, 45 cycles; 129 bp	NM016993
GAPDH	TAAAGAACAGGCTCTTAGCAC	AGTCTTGAAATGGATTGTCTC	95 °C 10 s; 95 °C 5 s, 59 °C 15 s, 45 cycles; 107 bp	NM017008

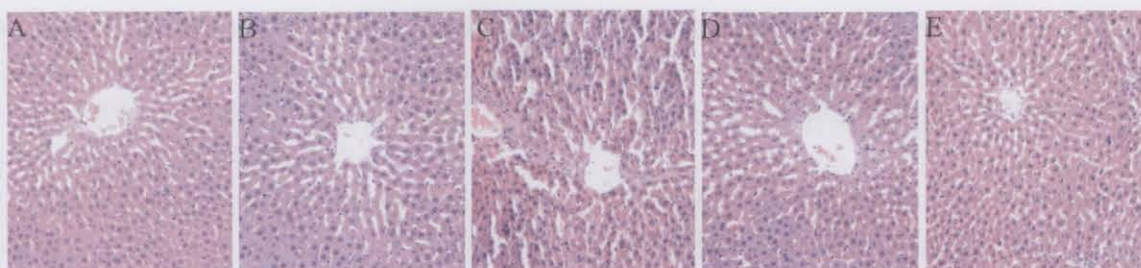


Figure 1 Effect of indole-3-carbinol (I3C) and curcumin on liver histopathology in pig serum-induced liver fibrosis of rats (HE staining, magnification 200×). A: Normal control; B: I3C control; C: Fibrotic control; D: Fibrotic + I3C (12 mg·kg⁻¹); E: Fibrotic + curcumin (200 mg·kg⁻¹)

2 I3C 对肝纤维化大鼠肝脏胶原的影响

2.1 肝组织 Masson 染色 Masson 染色显示: 正常对照组 (图 2A) 及 I3C 对照组 (图 2B) 仅有少量胶原表达于中央静脉壁及汇管区。模型对照组 (图 2C) 可见胶原纤维大量沉积于汇管区, 并沿汇管区向外延伸, 形成厚薄不一的纤维间隔, 分割包绕肝小叶, 局部有假小叶形成。与模型对照组相比, I3C 12 mg·kg⁻¹ 剂量组 (图 2D) 和姜黄素对照组 (图 2E) 的肝小叶结构基本恢复正常, 肝索排列较整齐, 胶原沉积明显减少, 纤维间隔变薄。Masson 图像分析 (图 3) 也证实, I3C 和姜黄素均能显著降低大鼠肝组织胶原纤维的含量 ($P < 0.01$)。

2.2 肝脏 Hyp 含量 与正常对照组相比, 模型对照组 Hyp 含量显著升高 ($P < 0.01$), 经 I3C 和姜黄素治疗后, 肝组织 Hyp 含量呈降低趋势 (表 2)。

3 I3C 对肝纤维化大鼠肝组织 α -SMA 表达的影响

正常对照组 (图 4A) 仅见 α -SMA 在血管壁及肝血窦 Disse 间隙内少量表达, 模型对照组 (图 4C) α -SMA 表达明显, 主要分布于窦周、胶原沉积处、纤维间隔处, I3C 12 mg·kg⁻¹ 剂量组 (图 4D) 和姜黄素对照组 (图 4E) 的 α -SMA 在表达范围、强度上都明显减轻。图像半定量分析结果见图 5 所示, I3C 各剂量组之间存在一定的量效关系。

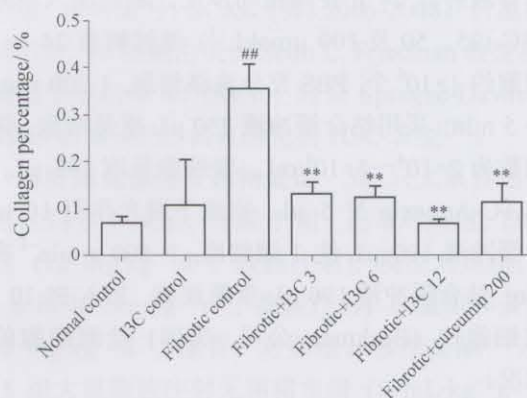


Figure 3 Effect of indole-3-carbinol (I3C, 3, 6, 12 mg·kg⁻¹) and curcumin (200 mg·kg⁻¹) on liver collagen percentage in pig serum-induced rat liver fibrosis by semiquantitative analysis using a Medical Color Image Analysis System. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. ## $P < 0.01$ vs normal control group; ** $P < 0.01$ vs fibrotic control group

Table 2 Effect of indole-3-carbinol and curcumin on hydroxyproline in pig serum-induced liver fibrosis of rats. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. ## $P < 0.01$ vs normal control group

Group	Dose/mg·kg ⁻¹	Hydroxyproline/ μ g·g ⁻¹
Normal control	—	187 ± 15
Indole-3-carbinol control	12	177 ± 26
Fibrotic control	—	266 ± 59 ^{##}
Fibrotic + indole-3-carbinol	3	225 ± 52
	6	217 ± 59
	12	215 ± 45
Fibrotic + curcumin	200	226 ± 23

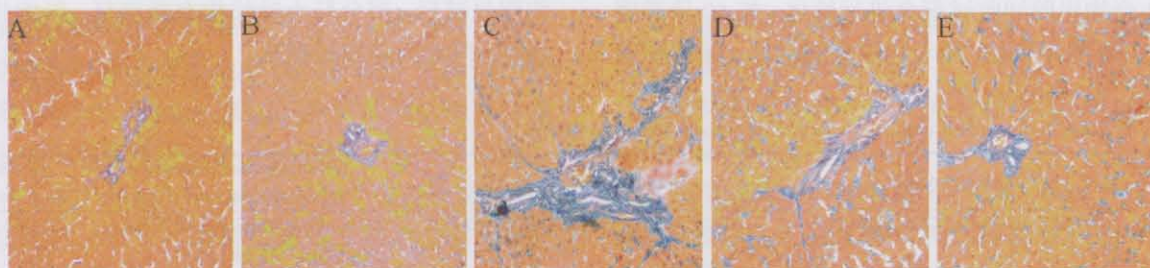


Figure 2 Effect of indole-3-carbinol (I3C) and curcumin on liver collagen secretion in pig serum-induced liver fibrosis of rats (Masson's trichrome staining, magnification 200×). A: Normal control; B: I3C control; C: Fibrotic control; D: Fibrotic + I3C (12 mg·kg⁻¹); E: Fibrotic + curcumin (200 mg·kg⁻¹)

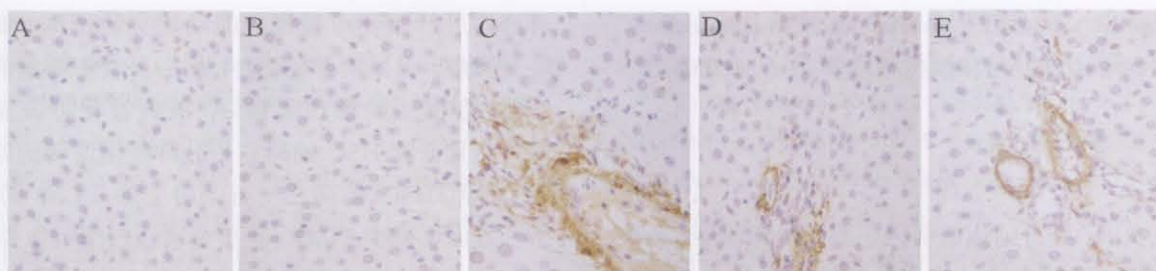


Figure 4 Effect of indole-3-carbinol (I3C) and curcumin on expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) by immunohistochemistry in pig serum-induced liver fibrosis of rats (magnification, 400 $\times$). A: Normal control; B: I3C control; C: Fibrotic control; D: Fibrotic + I3C (12 mg $\cdot$ kg $^{-1}$); E: Fibrotic + curcumin (200 mg $\cdot$ kg $^{-1}$)

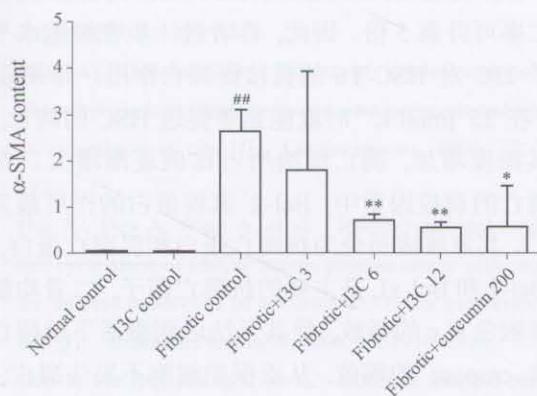


Figure 5 Effect of indole-3-carbinol (I3C, 3, 6, 12 mg $\cdot$ kg $^{-1}$) and curcumin (200 mg $\cdot$ kg $^{-1}$) on expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) in pig serum-induced liver fibrosis of rats by semiquantitative analysis using a Medical Color Image Analysis System. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ## $P < 0.01$ vs normal control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs fibrotic control group

4 I3C 对肝纤维化大鼠 HSC-T6 细胞凋亡的影响

4.1 I3C 对 HSC-T6 细胞凋亡率的影响 FITC-Annexin V/PI 双重染色后的流式细胞仪检测结果显示, I3C 处理 HSC-T6 细胞 24 h 后, 对照组 HSC 凋亡率仅 (8.6 $\pm$ 1.1)% (图 6A), 而 25 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$ I3C 即可

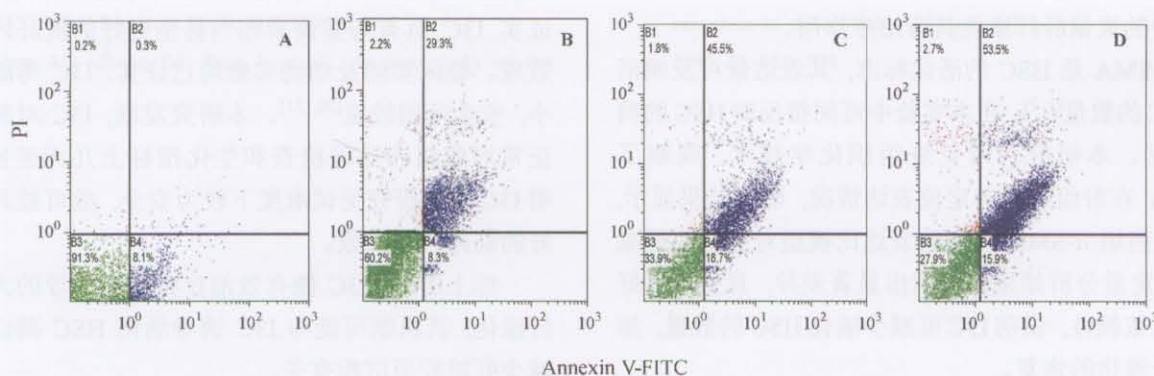


Figure 6 Effect of indole-3-carbinol (I3C) on the apoptosis rate of HSC-T6. Cells were treated with I3C for 24 h. Then Annexin V-FITC and propidium iodide (PI) were added as described in the manufacturer's instructions. A flow cytometric analysis was performed to quantify the percentage of live and apoptotic cells. A: Normal control; B: I3C (25 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$); C: I3C (50 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$); D: I3C (100 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$)

诱导 HSC-T6 细胞发生凋亡, 凋亡率为 (35.8 $\pm$ 5.1)% (图 6B), I3C (50 与 100 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$) 组的 HSC-T6 细胞的凋亡率分别为 (60.1 $\pm$ 4.0)% 和 (76.2 $\pm$ 4.4)%, 且主要引发细胞的晚期凋亡 (图 6C 和 6D)。

4.2 I3C 对 HSC-T6 细胞凋亡相关蛋白 mRNA 表达的影响 结果 (图 7) 显示, 与对照组相比, I3C (25~

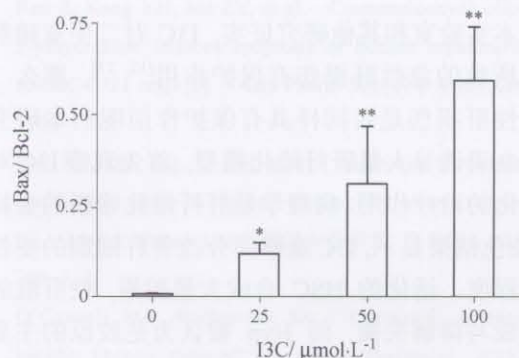


Figure 7 Effect of indole-3-carbinol (I3C) on the ratio of Bax and Bcl-2 mRNA expressions in HSC-T6. Cells were cultured with I3C for 24 h. Then, Bax and Bcl-2 mRNA expressions in the cells were determined by real time RT-PCR. GAPDH expression was also analyzed as a control. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 能显著升高 HSC-T6 细胞 Bax 与 Bcl-2 的 mRNA 表达比, 呈浓度依赖性变化 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

讨论

在我国, 肝纤维化的病因主要是病毒感染, 为免疫性损伤, 猪血清诱导的大鼠肝纤维化形成机制与其接近, 因此本研究选用免疫因素所致的实验大鼠肝纤维化模型。与常见的化学物质所致肝纤维化模型相比, 免疫性肝纤维化模型具有制作方法简单、来源丰富 (猪血清)、价格便宜、大鼠损伤小, 且基本不影响大鼠的生长、动物死亡率低、模型形成稳定等优点, 是研究肝纤维化较为理想的模型^[11]。本研究中, 猪血清处理大鼠 6 周后可见肝细胞脂肪变性明显, 肝脏门管区纤维组织增生, 部分伸入肝小叶, 同时肝脏 Hyp 含量明显升高, 说明本实验中肝纤维化模型的复制是成功的。

本实验室和其他研究证实, I3C 对二甲亚硝胺、乙醇所致的急性肝损伤有保护作用^[12, 13], 那么 I3C 对慢性肝损伤是否同样具有保护作用呢? 本研究利用猪血清诱导大鼠肝纤维化模型, 首先观察 I3C 对肝纤维化的治疗作用。病理学是肝纤维化诊断的金标准, HE 染色结果显示, I3C 能够部分改善肝细胞的变性和坏死程度。活化的 HSC 合成大量胶原, 使肝脏的胶原合成与降解失衡, 而 Hyp 被认为是胶原的主要成分, 因此本研究通过测定肝组织 Hyp 的含量来间接反映肝内胶原情况。结果显示, 模型对照组大鼠的肝组织 Hyp 含量较正常对照组明显增加, 而各给药组 Hyp 含量则有不同程度的下降, 这与 Masson 三色染色所观察到的肝脏胶原含量的半定量分析结果一致。以上结果说明, I3C 能够降低肝脏胶原沉积, 对猪血清诱导的大鼠肝纤维化具有治疗作用。

α -SMA 是 HSC 的活化标志, 其表达量可反映活化 HSC 的数量^[1, 2], 在本实验中可间接反映 HSC 的凋亡情况。本研究利用免疫组织化学技术, 观察了 α -SMA 在肝组织中的定位表达情况, 研究结果显示, I3C 给药组 α -SMA 的阳性表达比模型对照组明显减少, 半定量分析结果亦显示出显著差异, 且呈现良好的剂量依赖性, 说明 I3C 可减少活化 HSC 的数量, 加速肝纤维化的恢复。

越来越多的临床和实验研究证实, 肝纤维化甚至肝硬化是能够逆转的。干扰素和病毒唑治疗丙型肝炎患者已证实了肝纤维化的可逆性^[14]。另外, 也

有许多肝纤维化可被逆转的动物实验证据。Iredale 等^[15]发现, 大鼠给予 CCl_4 4 周后可发生明显的肝纤维化, 但是去除损伤因素后, 肝纤维化可恢复至正常。而且证实 HSC 的凋亡是肝纤维化逆转的始动因素, 因为 HSC 的凋亡一方面可去除 ECM 的来源, 另一方面可减少 TIMP (基质金属蛋白酶组织抑制剂, tissue inhibitor of metalloproteinases) 的来源, 减少其对胶原降解的抑制作用。随后, 他们又通过另一种体内肝纤维化模型——胆道结扎术, 发现了相似的现象^[16], 即随着 HSC 的激活, HSC 凋亡的易感性增加, 凋亡率可升高 5 倍。因此, 作者进一步在细胞水平观察了 I3C 对 HSC-T6 的直接促凋亡作用。结果显示, I3C 在 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时就能显著促进 HSC 的凋亡, 且随其浓度增加, 凋亡细胞所占比例逐渐增大。在细胞凋亡的调控因素中, Bcl-2 家族蛋白的作用最为重要^[17]。其家族成员分为抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白, 其中 Bcl-2 和 Bcl-xL 是主要的抗凋亡因子, 二者均能抑制细胞色素 c 的释放, 使其无法达到激活下游凋亡效应酶 caspase 的阈值, 从而保护细胞不发生凋亡; 而 Bax、Bid 等是促凋亡蛋白, 它们在其他凋亡因子激活下易位到线粒体膜上, 引起细胞色素 c 的释放, 诱发细胞凋亡。作者前期采用高通量蛋白芯片技术, 观察 I3C 对活化 HSC 内多种蛋白表达的影响, 发现 I3C 可通过抑制 NF- κ B 相关信号通路, 促进 HSC 凋亡^[18]。本研究采用实时荧光定量 PCR 检测, 发现 I3C 可通过升高 HSC 内 Bax/Bcl-2 的表达比值来发挥促凋亡作用, 且呈现良好的浓度依赖性。这些结果提示, I3C 可能通过诱导活化的 HSC 凋亡, 促进猪血清诱导的大鼠肝脏已沉积胶原的降解, 进而促进纤维化的逆转。

已知姜黄素能在多层次、多靶点上阻止肝纤维化的发生和发展^[19]。本研究将其作为阳性对照药物, 并证实 I3C 具有与姜黄素相当甚至更好的抗肝纤维化效应。临床实验及动物实验均已证实, I3C 毒副作用小, 安全范围较宽^[20, 21]。本研究发现, I3C 对照组与正常对照组在病理检查和生化指标上几无差别, 说明 I3C 在本研究受试浓度下较为安全, 故可能具有较好的临床应用前景。

综上所述, I3C 能有效治疗猪血清诱导的大鼠肝纤维化, 其机制可能与 I3C 诱导活化 HSC 凋亡继而减少肝脏胶原沉积有关。

References

- [1] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis [J]. J Clin Invest,

- 2005, 115: 209–218.
- [2] Gutierrez-Reyes G, Gutierrez-Ruiz MC, Kershenovich D. Liver fibrosis and chronic viral hepatitis [J]. Arch Med Res, 2007, 38: 644–651.
- [3] Kisseleva T, Brenner DA. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2007, 22: S73–S78.
- [4] Friedman SL, Bansal MB. Reversal of hepatic fibrosis – fact or fantasy? [J]. Hepatology, 2006, 43: S82–S88.
- [5] Aggarwal BB, Ichikawa H. Molecular targets and anticancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives [J]. Cell Cycle, 2005, 4: 1201–1215.
- [6] Plate AY, Gallaher DD. Effects of indole-3-carbinol and phenethyl isothiocyanate on colon carcinogenesis induced by azoxymethane in rats [J]. Carcinogenesis, 2006, 27: 287–292.
- [7] Hsu JC, Dev A, Wing A, et al. Indole-3-carbinol mediated cell cycle arrest of LNCaP human prostate cancer cells requires the induced production of activated p53 tumor suppressor protein [J]. Biochem Pharmacol, 2006, 72: 1714–1723.
- [8] Guo Y, Wu XQ, Zhang C, et al. Effect of indole-3-carbinol on ethanol-induced liver injury and acetaldehyde-stimulated hepatic stellate cells activation using precision-cut rat liver slices [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010, 37: 1107–1113.
- [9] Ping J, Li JT, Liao ZX, et al. Indole-3-carbinol inhibits hepatic stellate cells proliferation by blocking NADPH oxidase/reactive oxygen species/p38 MAPK pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2011, 650: 656–662.
- [10] Vogel S, Piantadosi R, Frank J, et al. An immortalized rat liver stellate cell line (HSC-T6): a new cell model for the study of retinoid metabolism *in vitro* [J]. J Lipid Res, 2000, 41: 882–893.
- [11] Zhang L, Peng X, Zhang Z, et al. Subcellular proteome analysis unraveled annexin A2 related to immune liver fibrosis [J]. J Cell Biochem, 2010, 110: 219–228.
- [12] Shen AG, Zhang BJ, Ping J, et al. *In vivo* study on the protection of indole-3-carbinol (I3C) against the mouse acute alcoholic liver injury by micro-Raman spectroscopy [J]. J Raman Spectrosc, 2008, 40: 550–555.
- [13] Shertzer HG, Tabor MW, Berger ML. Protection from *N*-nitrosodimethylamine-mediated liver damage by indole-3-carbinol [J]. Exp Mol Pathol, 1987, 47: 211–218.
- [14] Arthur MJ. Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C [J]. Gastroenterology, 2002, 122: 1525–1528.
- [15] Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis – hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors [J]. J Clin Invest, 1998, 102: 538–549.
- [16] Issa R, Williams E, Trim N, et al. Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors [J]. Gut, 2001, 48: 548–557.
- [17] Ren Z, Kang YH, Shi ZY, et al. Cinnamaldehyde ofloxacin-3-ylhydrazone induces apoptosis of human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2010, 45: 1109–1115.
- [18] Wei XN, Qin HQ, Li XH, et al. Molecular mechanisms of anti-fibrotic effect of indole-3-carbinol by protein array assays [J]. Med J Wuhan Univ (武汉大学学报 医学版), 2010, 31: 709–712.
- [19] O'Connell MA, Rushworth SA. Curcumin: potential for hepatic fibrosis therapy? [J]. Br J Pharmacol, 2008, 153: 403–405.
- [20] Reed GA, Peterson KS, Smith HJ, et al. A phase I study of indole-3-carbinol in women: tolerability and effects [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005, 14: 1953–1960.
- [21] Stresser DM, Williams DE, Griffin DA, et al. Mechanisms of tumor modulation by indole-3-carbinol. Disposition and excretion in male Fischer 344 rats [J]. Drug Metab Dispos, 1995, 23: 965–975.